

ステイン付着の評価を指向したQCM-Aによる アパタイト吸着特性評価の予備的検討

Evaluation of adsorption property of stain from teas onto apatite by QCM-A

清田 法子

Noriko SEIDA

1. 緒言

水晶振動子マイクロバランス (QCM) は分子レベルの相互作用、吸着などの現象を負荷重量の変化や負荷体のレオロジー変化の観点で観測する分子プローブとして近年広く利用されるセンサーである。ハイドロキシアパタイトのタンパク質吸着性を検討した報文やアパタイトをQCMに複合したデバイスを用いてその吸着特性評価を検討している報文は多数見られる[1-5]。QCMとアパタイトの複合系はペリクル、ステインなどの形成機構の解析やインプラント材料などとの相互作用などの解明に利用されているが、QCM上のアパタイト固定状態がQCMの応答特性に及ぼす影響やQCMの設置方法の影響など不確定なこともあり、データの蓄積によってQCMデータの信頼性向上と有効利用を図ることが期待される。口腔衛生の観点においてもステインなどの吸着動力学、口腔内の複合要因影響、形成抑制、洗浄効果などの分子レベルの簡易評価が可能であればQCMは有用な評価ツールになると考えられる。物理化学的観点ではハイドロキシアパタイト粒子のラフネスや表面結晶面とタンパク質、色素などの吸着に及ぼす影響の相関性や動力学的理解にも貢献する。そこで本研究では、QCMを用いた評価手順構築の予備検討としてハイドロキシアパタイトのナノ粒子を静電的に表面固定したQCMを作製し、ステイン形成に関わる基礎データ取得を試みた。

2. 試料ならびに実験方法

2.1 測定試料の作製

Okadaらの手法により電極表面の洗浄および電極表面の化学修飾を行い電極表面にマイナス電荷を導入し、ついでハイドロキシアパタイト (HAp) の吸着固定を行なった[1]。水晶振動子としてセイコー EG&G 社製の AT カット、金電極、基本振動数 $f_0 \approx 9$ MHz のものを用いた。はじめに以下の手順に従って、化学修飾に基づくアパタイトナノ粒子のQCM表面固定を行った。まず、ピラニア溶液 (硫酸: 過酸化水素=3:1 (v/v)) に水晶振動子を浸して十分洗浄し、水洗・乾燥後、すぐに3-メルカプトプロピオン酸 ($C_3H_5O_2$

S) のアルコール溶液 (1mg/ mL) に24時間浸漬した。この後、エタノールで洗浄してプロピオン酸修飾電極を作製した。Okadaらにより、プロピオン酸を化学修飾した電極表面の接触角や表面電位は 37° および -46 mV との報告がなされている。ついで、プロピオン酸を化学修飾したQCMを99.6%エタノール10ml (水0.4%) に浸し発振を安定させたのち、エタノールにハイドロキシアパタイトの球状ナノ粒子 (株式会社ソフセウ製、平均粒径約40nm) を分散した溶液 (0.5wt/vol-EtOH%) に素早く浸漬してハイドロキシアパタイトの吸着を開始した。プロピオン酸 (マイナス電荷) を化学修飾したQCMの電極表面に静電的相互作用を利用してハイドロキシアパタイトのナノ粒子を吸着固定させた。固定される様子はQCM応答挙動 (共振周波数 f_r および共振抵抗 $R (=1/G)$) をもとに観測した。タンパク質の吸着実験を行う前にナノ粒子を静電的に吸着固定したQCMの発振挙動はリン酸緩衝溶液中で安定であることを確認した。

2.2 タンパク質吸着

ハイドロキシアパタイトの吸着特性評価試験ではしばしば酸性タンパク質としてアルブミン、塩基性タンパク質としてリゾチームが用いられている。ハイドロキシアパタイトには塩基性タンパク質に比べ酸性タンパク質が多く吸着することが知られているが、表面ゼータ電位に基づき吸着表面の電位の影響と考えられている。本検討では牛血清アルブミン (BSA) を用いた。牛血清アルブミン (和光純薬工業株式会社製, $M_w=66000$) をリン酸緩衝溶液 (PBS) に溶解し試験溶液を調整した (リン酸濃度10mM、pH=7、BSA濃度1mg/1ml PBS、0.2マイクロメートルのメンブレンフィルターをパスしたもの)。室温で本溶液にHApナノ粒子を吸着したQCMを浸漬し、QCMの発振挙動をネットワークアナライザーを用いたアドミッタンス解析によりモニターした。QCMをテフロン製のセルに固定し、所定濃度のタンパク質溶解液と接触させた。接触後に、共振周波数 f_r および共振抵抗 $1/G (=R)$ の経時変化をモニター

ングした。

2.3 紅茶、ほうじ茶抽出液中におけるHAp修飾 QCM の応答挙動

80℃の蒸留水にて市販の紅茶（ダージリンティー）およびほうじ茶（伊藤園）のティーバックから2分抽出により試験液を調整した。文部科学省の食品成分データベースによると紅茶については標準的な成分はカテキン、カフェイン、塩分などであり、カテキンがステインの原因になることは知られている。一方、ほうじ茶については製造元の資料によると抽出液125mlあたりにカテキン27mg、カフェイン8mg、塩分0.02gが含まれる。化学修飾したQCMをはじめは蒸留水10ml中に浸漬し発振が安定化するまで待ち、安定になったところで抽出したお茶10ml中に素早く浸漬して応答（ f_r および R ）を観察した。測定は室温にて行った。この測定ではQA922（セイコー EG&G 社製）を用いて測定した。

3. QCM 測定

Advantest 社製のネットワークアナライザー r3755を用いたアドミッタンス解析を用いた測定（QCM-A）を行った。アドミッタンス解析は、共振点近傍で周波数を走引しながらアドミッタンスの実数成分 G （コンダクタンス）と虚数成分 B （サセプタンス）を測定している。これにより、 G 値と B 値の周波数依存スペクトルが得られ、このスペクトルからコンダクタンス G の最大値の周波数を共振周波数 f_r 、 G 値の逆数を共振抵抗 R 、サセプタンス B の極大、極小値の周波数 f_1 、 f_2 が得られる（図1参照）。 G （ $=1/R$ ）と B 値からいわゆるアドミッタンス円が得られる（図1）。用いたネットワークアナライザーの測定精度の制約下で測定するため、可能な限り解像度（測定点数800点/1scan）を高くして共振点近傍の測定点を多くとれるように計測条件を設定した。 f_r はQCM上の負荷試料の重量変化や粘弾性変化を反映し、負荷重量が増加すると f_r は低周波数側にシフトする。 $1/G$ （ $=R$ ）は試料の粘性を反映する指標でありQCMの負荷試料の粘性が増加すると R 値は大きくなる。 f_r および R 値の簡易測定としてセイコーEG&G社製のQA922を用いた測定も行った。この際、テフロン製のリザーバー付きセルを用いた系の測定を行なった。テフロン製セルにQCMを固定し、QCMの片面のみ試料と接触させる測定系を適用した。なお測定は室温で行い、用いた溶液類は室温のものを用いた。

4. 結果

4.1 QCM 表面の電荷導入およびHApナノ粒子吸着固定

図2にハイドロキシアパタイト（HAp）ナノ粒子分散エタノール中におけるプロピオン酸で化学修飾したQCMの応答曲線（吸着応答曲線）を示す。 G プロファイルで観察すると、ピーク値である共振周波数 f_r はHApナノ粒子の分散液と接触した後すぐに低周波数側にシフトしはじめ、10分程度で定常値に漸近した。その後も数時間かけてゆっ

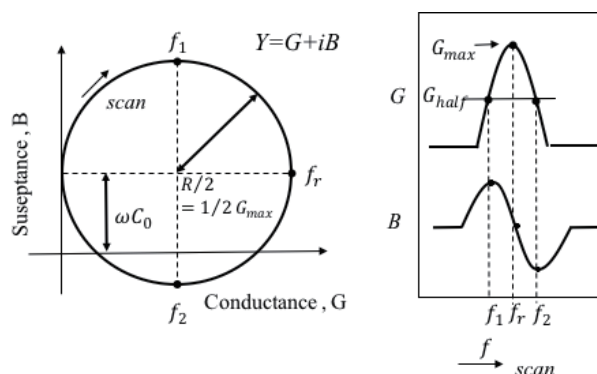


図1. アドミッタンス解析—アドミッタンス円と G , B スペクトル

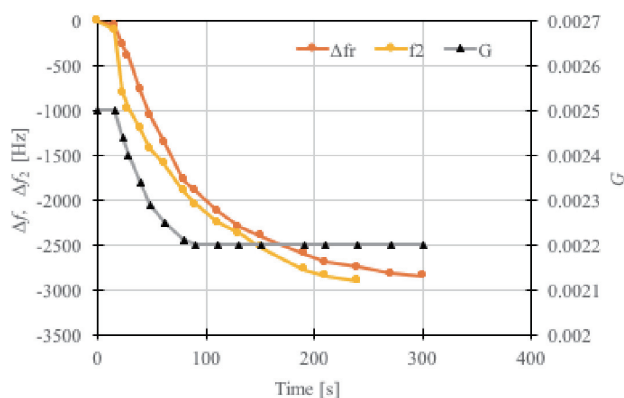


図2. アパタイト吸着過程のQCM 応答 (r3755で測定)

くりと低周波数側にシフトして平衡値と思われる値に落ち着いた。同様の挙動は G 値にも見られた。

図3には、QA922を用いて、HApナノ粒子の吸着過程を簡易測定した結果を示す。気相中からエタノール溶液（99.6%、 H_2O 0.4%、HApナノ粒子なし）にQCMを浸漬すると共振周波数 f_r および共振抵抗値 R は非常に大きくシフトする。溶媒との接触によりこれらの値がシフトすることは一般的に知られていることであるが、今回用いたQCMにおいては粘性指標である共振抵抗 R の変化は非常に大きいことがわかる。エタノール中で発振が安定したことを確認したのち、素早くQCMを引き上げHApナノ粒子分散エタノールに浸漬すると、初期に発振の乱れがあるものの数十秒で素早く安定的に発振し、HApナノ粒子の吸着の様子をモニターしている。共振周波数 f_r は時間の経過とともに低周波数側にシフトし、同時に共振抵抗値 R は増加している。この変化は10分程度続き、ここでQCMを引き上げて乾燥させると、 f_r および R 値はHApナノ粒子吸着前と比べて大きく変化しておりHApナノ粒子が吸着したものと解釈できる。

4.2 BSA吸着

HApナノ粒子を吸着固定したQCMをBSAを含むPBS溶液（pH=7.0）に浸漬した。浸漬初期から発振の揺らぎが大きく、BSA吸着を示す優位な変化を観測することができなかった。

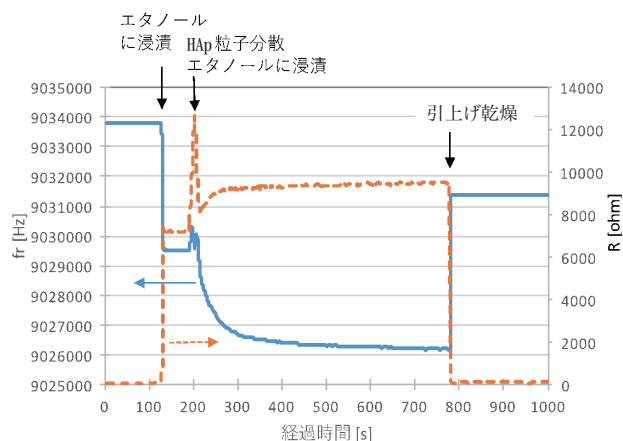


図3. プロピオン酸修飾 QCM の HAp 粒子吸着過程の応答 (f_r : 共振周波数, R : 共振抵抗, QA922にて測定)

4.3 未修飾 QCM の応答挙動

図4に未修飾の QCM について、気相から蒸留水中に QCM を浸漬した場合の応答挙動を示す。水中に QCM を浸漬した際、初期に発振の乱れが観測され f_r 、 R 値ともに振動が不安定になるが数十秒で発振は安定になった。図中の拡大図に示すように、未修飾の QCM においても水中では数 Hz 程度の揺らぎが観測される。なお、本研究では、表面ラフネスが十数 nm 程度の鏡面仕上げ処理した QCM を用いている。

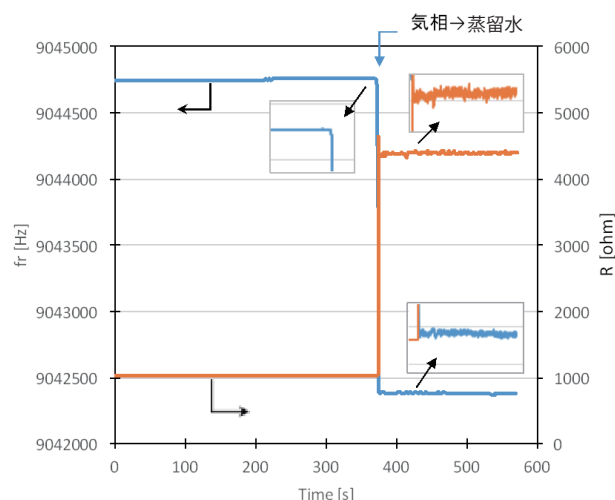


図4. 表面未修飾 QCM の蒸留水中における共振周波数 f_r および共振抵抗 R の変化 (気相→蒸留水)

図5に未修飾の QCM をテフロン製のリザーバー付きセルに設置した系 (片面液接触) の応答を示す。QCM をセルに固定することによって、共振抵抗値 R は非常に大きく増加してしまう。セルに 200 μ L の蒸留水を投入 (水に接触させる) すると、 f_r の振動は大きくなりドリフトするものの数分で安定している。ついで、蒸留水を除去し 200 μ L のほうじ茶を投入したところ、 f_r が低周波数側へゆっくりとシフトした。一方、 R 値も低下し、粘性の低下を示した。金電極表面にお茶の成分が吸着し、時間とともに強く吸着したものと考えられる。

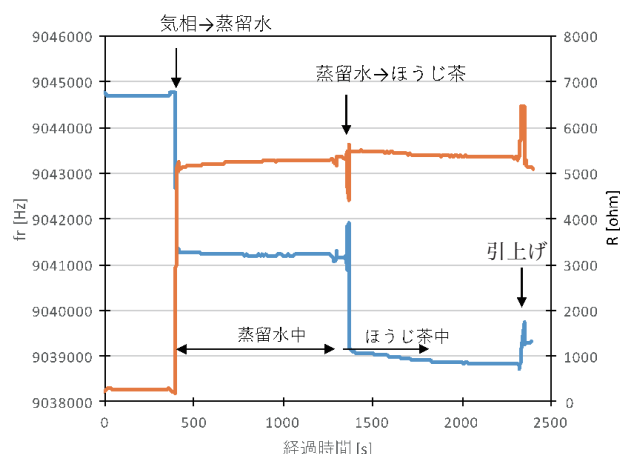


図5. 表面未修飾 QCM の蒸留水中及びほうじ茶中における共振周波数 f_r および共振抵抗 R の変化 (テフロンセル固定, 片面液接触系)

4.4 お茶中における HAp 修飾 QCM の応答挙動

図6に紅茶中における HAp 修飾 QCM 応答を示す。この測定は QCM 両面が紅茶と接触するように QCM を非固定で紅茶中に浸漬して測定した。始めに QCM を蒸留水中に浸漬し発振が落ち着いたところで水中における発振挙動を確認した後、ついで QCM を紅茶の溶液に移し挙動を観測した。図に示すように紅茶と接触するとすぐに f_r の低下が見られ、(初期の不連続な低下は溶液の粘度が異なることに起因すると考えられる)、同時に R 値の増加が認められる。図6の結果は、紅茶の成分がアパタイトに吸着することを示唆する。

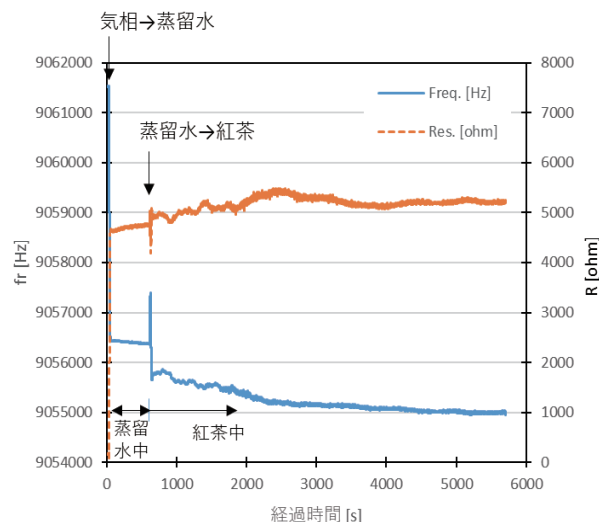


図6. 紅茶中における HAp 固定 QCM の応答 (液中 QCM 浸漬, 両面吸着)

図7にほうじ茶中における HAp 修飾 QCM 応答を示す。この測定はリザーバー付きテフロンセルに QCM を固定した系で測定を行なった。本系も始めに QCM を 200 μ L の蒸留水と接触させ、発振が落ち着いたところで蒸留水を 200 μ L のほうじ茶に入れ替え測定を行なった。この系は、紅茶を測定した系 (QCM を溶液中に浸漬して両面吸着させる測定方法) に比べると f_r のシフトは小さくなってしまふものの、 f_r の低周波数側シフトは認められる。同時に R 値

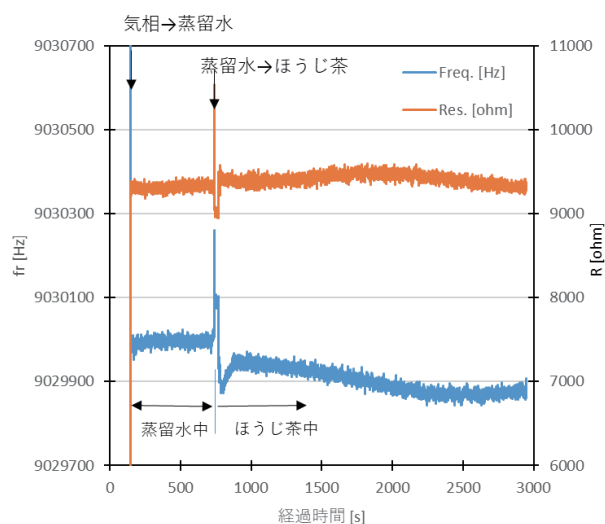


図7. ほうじ茶中におけるHAp固定QCMの応答
(QCMセル固定, 片面吸着)

は一度増加し緩やかに減少した。図6、7の結果は、ハイドロキシアパタイトのステイン形成物質吸着データが取得可能であることを示している。

5. 考察

図2で見られた共振周波数 f_r の低周波数側シフトはHApの吸着に起因すると考えられるが、 f_r の低周波数側シフトとともに G 値(=1/R)も小さくなっていることから、時間の経過とともにQCMにかかる負荷の粘性が増加していることを意味する。ここで負荷とは金電極に化学的に修飾したプロピオン酸およびこれに静電的に吸着しているHApナノ粒子のことである。共振周波数 f_r は粘性変化のある系では粘性の影響によってもシフトするので、試料の弾性的変化や吸着による質量負荷の変化を正確に評価するには粘性変化をできるだけ排除した観測も必要である。粘性の影響が少なく質量負荷の変化のみを評価するシグナルとして f_s が知られている。図2には f_s の変化を測定し併記した。 f_s は負荷物質の重さの影響を反映し粘性の影響が小さい(系によっては粘性影響フリー)という報告[5]を参考にすると、共振周波数 f_r の減少とともに f_s の優位な減少が見られるため、HApナノ粒子が吸着した結果、 f_s はもとより f_r が低周波数側にシフトしたと言える。その後かなり長時間にわたり f_s は僅かながら低周波数側にシフトしたことからアパタイト粒子吸着平衡に要する時間は長いと考えられる。もしくは、HApナノ粒子の吸着に伴いプロピオン酸のコンホメーション変化や溶媒和変化が誘発され、密に吸着したHApナノ粒子の再配列が起こることなども考えられる。HApナノ粒子の吸着によるプロピオン酸の空間配置の変化や吸着によるゆらぎの変化などに起因する影響の詳細については、関与する物質数や溶媒等を変化させて解析することによって明らかにする必要があり今後の課題である。

アルブミン溶液との接触時における共振周波数 f_r と共振抵抗 R 値の経時変化は揺らぎによる振動が大きくS/Nが不良なため優位な観測が困難であった。アパタイトに対する

BSAの吸着に関する既存の報告[3]を参考にすると、本試験の条件で100Hz程度の f_r のシフトが予想されたが優位なシフトが観測されなかった。今回用いたHAp粒子及びその固定法では、固定しているHAp粒子のサイズが40nmと比較的大きく、さらにQCMの表面グラフト鎖上に吸着固定していることがゆらぎの大きな原因と考えられる。実際、HAp粒子を固定したQCMの粘性(R 値)は非常に大きくなっておりこのことを示唆している。精度良いBSE吸着の観測を行うためにはHApの電極固定方法がとても重要であることが改めてわかった。

図5の結果からわかるように、QCMの固定は大きな粘性変化及び周波数シフトを起こし、精度良い測定においては改良の余地がある。図5の結果から未修飾の電極(Au表面)においてもお茶の成分が吸着すると考えられる。今回使用したQCMは電極部分の表面を鏡面研磨し、表面ラフネス十数nm程度に平坦化していることから、細孔吸着とは異なるメカニズムでお茶の成分が吸着すると考えられる。一般的に表面電位と吸着性の相関で解釈するアプローチがあることから、今後、リン酸緩衝液中の表面電位評価などを併行した解析が必要である。今回、優位なBSA吸着を観測できなかったが、ハイドロキシアパタイトにBSAが吸着することは多くの報文で知られていることであり、安定した精度の高いQCM測定について改良が必要である。QCM上の負荷物の粘性が高い場合には f_r の揺らぎも大きくなることが予想されることから、アパタイトの固定化方法の検討が必要である。

図6、7の結果(お茶と接触後の f_r および R の挙動)は、お茶の成分が吸着していることに起因すると考えられる。先に示したように、用いたQCMのBSA吸着が優位に確認できなかったためお茶の成分の吸着サイトは確定できないが、Au表面をプロピオン酸で化学修飾していること、プロピオン酸のカルボキシル基の何割かはハイドロキシアパタイトのナノ粒子と相互作用していること、電極表面はアパタイトのナノ粒子で被覆されていること、 f_r の変動幅が大きいことなどから、お茶の成分がアパタイトの表面に吸着している様子を観測していると予想される。ほうじ茶の場合には R 値が一旦増加後に減少することから、吸着の様子が時間の経過とともに変化するものと考えられる。吸着サイト及び吸着メカニズムについてはBSAの影響も含め、今後、妥当な評価方法を検討する必要がある。

6. まとめ

分子レベルのステイン形成性について簡易評価法の手順を構築する予備検討として、球形ハイドロキシアパタイト(HAp)のナノ粒子を表面固定したQCMを作製し、紅茶及びほうじ茶抽出液中におけるQCMの応答挙動を観察した。HApナノ粒子の吸着挙動は、共振周波数 f_r の低周波シフトおよび共振抵抗 R 値の増加によって容易に確認できた。一方、BSAを用いたQCM固定HApへの吸着挙動は f_r および R 値のS/Nが不良のため優位な測定ができなかった。BSA接触処理を行ったHApナノ粒子固定QCMを紅茶および

ほうじ茶と接触させ、QCM の応答挙動を観察した。HAp ナノ粒子未修飾の QCM についても同様の比較実験を行い、ステイン形成成分の吸着に起因すると思われる f_i および R 値の変動を観察した。本検討により、多様なアパタイト条件におけるステイン形成成分の吸着初期挙動を簡易に測定する手順を構築する見込みを得ることができた。BSE の吸着については S/N の改善と標準的測定条件・手順を構築する必要があることを把握した。

7. 参考文献

- [1] Masahiro Okada, Keiko Furukawa, Takeshi Serizawa, Yoshihiko, Yanagisawa, Hidekazu Tanaka, Tomoji Kawai, and Tsutomu Furuzono, Interfacial Interactions between Calcined Hydroxyapatite Nanocrystals and Substrates, *Langmuir*, 25(11), pp.6300-6306 (2009), DOI: 10.1021/la804274q
- [2] Tomohiko Yoshioka, Hiroshi Yonekura, Toshiyuki Ikoma, Motohiro Tagaya and Junzo Tanaka, Investigation of Multilayered Protein Adsorption on Carbonate Apatite with a QCM Technique, *Key Engineering Materials*, Online 2012-11-29, ISSN:1662-9795, Vols.529-530, pp.74-77, DOI:10.4028/www.scientific.net/KEM.529-530.74, Trans. Tech. Publications, Switzerland
- [3] Toshiyuki Ikoma, Motohiro Tagaya, Nobutaka Hanagata, Tomohiko Yoshioka, Dinko Chakarov, Bengt Kasemo and Junzo Tanaka, Protein Adsorption on Hydroxyapatite Nanosensors with Different Crystal Sizes Studied In Situ by a Quartz Crystal Microbalance with the Dissipation Method, *J. Am. Ceram. Soc.*, 92(5), pp.1125-1128 (2009), DOI: 10.1111/j.1551-2916.2009.02957.x
- [4] J. Langford, K. D. Pavey, C. J. Olliff, P. J. Cragg, G. W. Hanlon, F. Paul and G. D. Rees, Real-time monitoring of stain formation and removal on calcium hydroxyapatite surfaces using quartz crystal sensor technology, *Analyst*, 127, pp.360-367(2002), DOI: 10.1039/b109684m
- [5] Kota Shiba, Satoshi Motozuka, Tadashi Yamaguchi, Nobuhiro Ogawa, Yuichi Otsuka, Kiyoshi Ohnuma, Takuya Kataoka and Motohiro Tagaya, Effect of cationic surfactant micelles on hydroxyapatite nanocrystal, Formation: An Investigation into the Inorganic-Organic Interfacial Interactions, *Cryst. Growth Des.*, 16, pp.1463-1471(2016), DOI: 10.1021/acs.cgd.5b01599
- [6] Yoshimi Seida, Refitting evaluation of viscoelastic parameters in QCM-A measurement of large viscosity load, *J. Toyo Univ., Nat. Sci. Lab.*, 60, pp.85-92(2016)